

16

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-093091

(43)Date of publication of application : 02.04.2003

(51)Int.Cl.

C12P 19/26  
// C12N 15/09

(21)Application number : 2002-208987

(71)Applicant : YAMASA SHOYU CO LTD

(22)Date of filing : 18.07.2002

(72)Inventor : HAMAMOTO TOMOKI  
NOGUCHI TOSHITADA

(30)Priority

Priority number : 2001219242

Priority date : 19.07.2001

Priority country : JP

## (54) METHOD FOR PRODUCING CMP-N-ACETYLNEURAMINIC ACID

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an improved method for producing cytidine 5'-monophosphoric acid(CMP)-N-acetylneuraminic acid(NeuAc) as an important raw material for sugar chain synthesis.

SOLUTION: This method for producing the CMP-NeuAc(N-acetylneuraminic acid) comprises carrying out reaction by adding, to a reaction system including N-acetylglucosamine(GlcNAc), pyruvic acid and CMP, yeast cells, microbial cells having GlcNAc-6P 2-epimerase activity or a treated product thereof, microbial cells having NeuAc lyase activity or a treated product thereof, and microbial cells having CMP-NeuAc synthase activity or a treated product thereof. The other version of this method comprises carrying out reaction by adding, to a reaction system including GlcNAc and CMP, yeast cells, microbial cells having GlcNAc-6P 2-epimerase activity or a treated product thereof, microbial cells having NeuAc synthase activity or a treated product thereof, and microbial cells having CMP-NeuAc synthase activity or a treated product thereof.

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公 開 特 許 公 報 ( A )

(11)特許出願公開番号  
特開2003-93091  
(P2003-93091A)

(43)公開日 平成15年4月2日(2003.4.2)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	ターム* (参考)	
C 1 2 P 19/26	Z N A	C 1 2 P 19/26	Z N A	4 B 0 2 4
// C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A	4 B 0 6 4

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 13 頁)

(21)出願番号	特願2002-208987(P2002-208987)	(71)出願人	000006770 ヤマサ醤油株式会社 千葉県銚子市新生町2丁目10番地の1
(22)出願日	平成14年7月18日(2002.7.18)	(72)発明者	浜本 智樹 千葉県銚子市春日町35-3-205
(31)優先権主張番号	特願2001-219242(P2001-219242)	(72)発明者	野口 利志 千葉県銚子市栄町2-1-12
(32)優先日	平成13年7月19日(2001.7.19)	Fターム(参考)	4B024 AA01 BA07 CA03 DA06 EA04 4B064 AF21 CA02 CA06 CD01 CD07 CD12 DA01
(33)優先権主張国	日本 ( J P )		

(54)【発明の名称】 CMP-N-アセチルノイラミン酸の製造法

(57)【要約】

【課題】本発明は、糖鎖合成の重要な原料であるCMP-NeuAcの改良された製造法を提供する。

【解決手段】本発明は、GlcNAc、ビルビン酸およびCMPを含有する反応系に、酵母菌体、GlcNAc-6P 2-エピメラーゼ活性を有する菌体またはその処理物、NeuAcリアーゼ活性を有する菌体またはその処理物およびCMP-NeuAcシンセターゼ活性を有する菌体またはその処理物を添加し、反応させることを特徴とする、CMP-NeuAcの製造法に関する。また、本発明は、GlcNAcおよびCMPを含有する反応系に、酵母菌体、GlcNAc-6P 2-エピメラーゼ活性を有する菌体またはその処理物、NeuAcシンセターゼ活性を有する菌体またはその処理物およびCMP-NeuAcシンセターゼ活性を有する菌体またはその処理物を添加し、反応させることを特徴とする、CMP-NeuAcの製造法に関する。

## (2) 開2003-93091 (P2003-9織

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、ヒルビン酸およびシチジン5'-モノリン酸 (CMP) を含有する反応系に、酵母菌体、N-アセチルグルコサミン-6リン酸 2-エピメラーゼ (GlcNAc-6P 2-エピメラーゼ) 活性を有する菌体またはその処理物、N-アセチルノイラミン酸リアーゼ (NeuAcリアーゼ) 活性を有する菌体またはその処理物およびCMP-N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ (CMP-NeuAcシンセターゼ) 活性を有する菌体またはその処理物を添加し、反応させることを特徴とする、CMP-N-アセチルノイラミン酸 (CMP-NeuAc) の製造法。

【請求項2】 N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) およびヒルビン酸を含有する反応系に、N-アセチルグルコサミン-6リン酸 2-エピメラーゼ (GlcNAc-6P 2-エピメラーゼ) 活性を有する菌体またはその処理物およびN-アセチルノイラミン酸リアーゼ (NeuAcリアーゼ) 活性を有する菌体またはその処理物を添加してN-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) を合成し、続けて、この反応系にシチジン5'-モノリン酸 (CMP)、酵母菌体およびシチジン5'-モノリン酸N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ (CMP-NeuAcシンセターゼ) 活性を有する菌体またはその処理物を添加してCMP-N-アセチルノイラミン酸 (CMP-NeuAc) を合成する、請求項1記載の製造法。

【請求項3】 N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) およびシチジン5'-モノリン酸 (CMP) を含有する反応系に、酵母菌体、N-アセチルグルコサミン-6リン酸 2-エピメラーゼ (GlcNAc-6P 2-エピメラーゼ) 活性を有する菌体またはその処理物、N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ (NeuAcシンセターゼ) 活性を有する菌体またはその処理物およびCMP-N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ (CMP-NeuAcシンセターゼ) 活性を有する菌体またはその処理物を添加し、反応させることを特徴とする、CMP-N-アセチルノイラミン酸 (CMP-NeuAc) の製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、糖鎖合成の重要な原料であるCMP-N-アセチルノイラミン酸 (CMP-NeuAc) の改良された製造法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】近年、糖鎖に関する構造及び機能に関する研究が急速に進み、生理活性を有するオリゴ糖、糖脂質、糖蛋白質などの医薬品または機能性素材としての用途開発が注目を集めている。中でもその末端にN-アセ

チルノイラミン酸 (NeuAc) を含むシアル酸含有糖鎖は、細胞接着やウィルスの感染の際の受容体となる等の重要な機能を有する糖鎖である。

【0003】シアル酸含有糖鎖は、一般にシアル酸転移酵素の触媒により合成される。シアル酸転移酵素はCMP-N-アセチルノイラミン酸 (CMP-NeuAc) を糖供与体として、受容体となる糖鎖にシアル酸を転移する酵素である。

## 【発明が解決しようとする課題】

【0004】しかしながら、糖供与体として用いるCMP-NeuAcは非常に高価で、かつ量的にも試薬レベルの僅かな供給量でしか供給され得ないのが現状である。CMP-NeuAcの製造法としては、シチジン5'-トリリン酸 (CTP) とNeuAcを基質としてCMP-NeuAcシンセターゼの触媒により合成する方法 (Appl. Microbiol. Biotechnol., 44, 59-67 (1995)) が知られているが、その原料となるCTP及びNeuAcは高価であるため、それらを直接原料として合成されたCMP-NeuAcも高価な試薬とならざるを得ない。

【0005】最近、小泉らにより、オロチン酸からウリジン 5'-トリリン酸 (UTP) への変換を行う *Brevibacterium ammoniagenes* 菌体、UTPからCTPへの変換反応を触媒するCTP合成酵素を生産する組換え大腸菌体およびCMP-NeuAc合成酵素を生産する組換え大腸菌体を組み合わせて、オロチン酸とNeuAcを原料としてCMP-NeuAcを合成する方法が開発された (Appl. Microbiol. Biotechnol., 53, 257-261, (2000))。該方法は、高価なCTPを使用しない方法ではあるが、複数種の菌体を調製しなければならないなど工程が煩雑であるとともに、それを実施するための大型の設備を準備しなければならない、また依然として高価なNeuAcを原料としていることから実用的な方法とはいえない難かった。

【0006】NeuAcの製造法に関しては、従来、ウミツバメの巣などからの抽出する方法 (Carbohydrate Research, 56, 423 (1977)) や、シアル酸の多量体であるコロミン酸を微生物から回収し、これを化学分解し回収する方法 (Agric. Biol. Chem., 37, 2105-2110 (1973)) が知られているが、最近になって酵素を利用した方法が開発されている。

【0007】酵素を利用した方法としては、(1) NeuAcリアーゼまたはNeuAcシンセターゼを用いて、N-アセチルマンノサミン (ManNAc) から製造する方法 (J. Am. Chem. Soc., 110, 6481 (1988), J. Am. Chem. Soc., 110, 7159 (1988)、特開平10-4961)、(2) アルカリ条件下で、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) をN-アセチルマンノサミン (ManNAc) に変換させ、これにNeuAcリアーゼまたはNeuAcシンセターゼを作用させてNeuAcを製造する方法

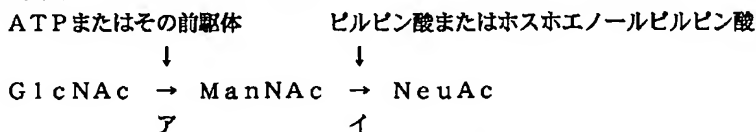
(3) 開2003-93091 (P2003-9%A)

(特開平5-211884、Biotechnology And Bioengineering, Vol. 66, No. 2 (1999)、Enzyme Microb. Technol., Vol. 20 (1997))、(3) GlcNAcからManNAcへの変換を触媒するN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 2-エピメラーゼとNeuAcリアーゼまたはNeuAcシンセターゼを用いて、GlcNAcから製造する方法 (W095/26399、特開平3-180190、特開2001-136982) が報告されている。

【0008】しかしながら、(1)の方法は原料であるManNAcが高価であり、(2)の方法は、安価なG

lcNAcを原料とする方法ではあるが、GlcNAcとManNAcの混合物からManNAcを精製する工程が煩雑であるという問題があった。また、下記に示すように、(3)の方法で用いるGlcNAc 2-エピメラーゼが高い触媒活性を示すためにはATPが必要であるため、高価なATPを添加するかあるいは微生物を用いてATPの前駆体であるアデニンからATPを生成させる必要があり、この方法も満足いく方法とはいえない難かった。

【0009】(3)の方法



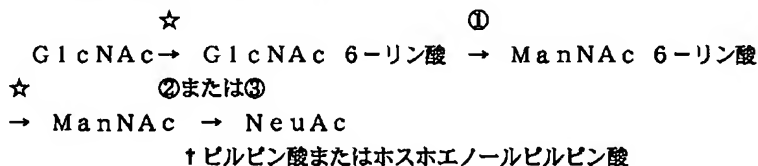
ア: GlcNAc 2-エピメラーゼ

イ: NeuAcリアーゼまたはNeuAcシンセターゼ  
【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、GlcNAcを基質とした大腸菌の生体内酵素によるNeuAc合成を検討したところ、NeuAcはほとんど合成されなかったが、GlcNAcがGlcNAc 6-リン酸 (GlcNAc-6P) に変換されたことから、下に示

す経路によるGlcNAcからのNeuAc合成系の構築を試みた。その結果、GlcNAc-6P 2-エピメラーゼ (EC5.1.3.9) およびNeuAcリアーゼまたはNeuAcシンセターゼ活性を増強させるとNeuAcを高収率で生成できること、また該合成系には高価なATPを必要としないことを見出した。

【0011】



☆: 生体反応

①: GlcNAc-6P 2-エピメラーゼ

②: NeuAcリアーゼ

③: NeuAcシンセターゼ

【0012】次に、CMP-NeuAc合成反応を行うためのCTP合成系について、安価なCMPを原料としての微生物によるCTPへの変換系を上記NeuAc合成系と組み合わせるべく、種々の微生物を用いて検討を行った。すると、大腸菌その他の微生物を用いたときにはCMP-NeuAcがわずかに合成されなかったのに対して、酵母菌体を用いると高収率でCMP-NeuAcを合成できることを見出した。特に、NeuAcシンセターゼ反応に必要なホスホエノールビルビン酸 (PEP) は、酵母菌体内のものを利用することができ、反応系に新たに添加する必要がないことを確認し、本発明を完成させた。

【0013】すなわち、本発明は、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、ビルビン酸およびシチジン 5'-モノリン酸 (CMP) を含有する反応系に、酵母菌体、N-アセチルグルコサミン-6リン酸 2-エピメラーゼ (GlcNAc-6P 2-エピメラーゼ) 活性を有する菌体またはその処理物、N-アセチルノイラミン酸リアーゼ (NeuAcリアーゼ) 活性を有する菌体

またはその処理物、およびCMP-N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ (CMP-NeuAcシンセターゼ) 活性を有する菌体またはその処理物を添加し、反応させることを特徴とする、CMP-N-アセチルノイラミン酸 (CMP-NeuAc) の製造法に関するものである。

【0014】また、本発明は、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) およびシチジン 5'-モノリン酸 (CMP) を含有する反応系に、酵母菌体、N-アセチルグルコサミン-6リン酸 2-エピメラーゼ (GlcNAc-6P 2-エピメラーゼ) 活性を有する菌体またはその処理物、N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ (NeuAcシンセターゼ) 活性を有する菌体またはその処理物およびCMP-N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ (CMP-NeuAcシンセターゼ) 活性を有する菌体またはその処理物を添加し、反応させることを特徴とする、CMP-N-アセチルノイラミン酸 (CMP-NeuAc) の製造法に関するものである。

【0015】

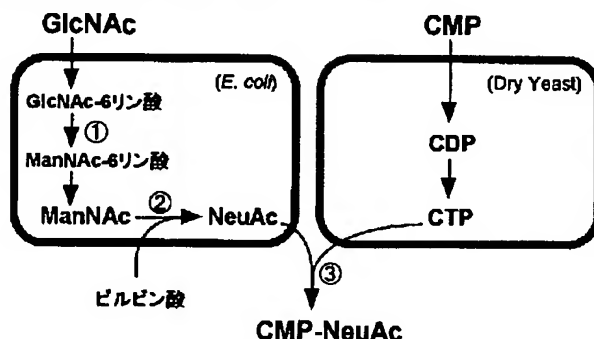
【発明の実施の形態】本発明のCMP-NeuAcの合成反応経路を模式的に示すと、以下の(A) NeuAcリアーゼを用いた方法と(B) NeuAcシンセターゼ

(4) 開2003-93091 (P2003-9; 織

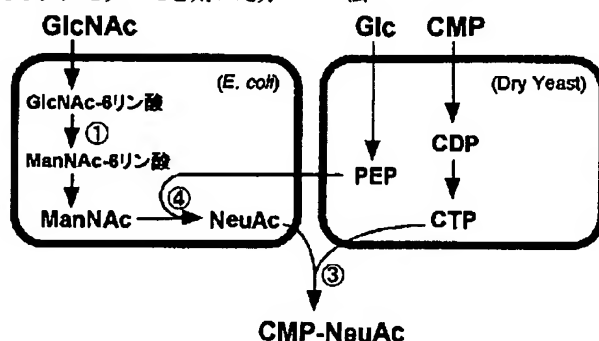
を用いた方法である。なお、(B)の反応系に必須のホスホエノールビルビン酸 (PEP) は、グルコースから酵母並びに大腸菌の生体 (代謝) 反応により合成、供給

されるので、反応系にホスホエノールビルビン酸 (PEP) を添加する必要はない。

【0016】(A) NeuAc リアーゼを用いた方法



【0017】(B) NeuAc シンセターゼを用いた方



【0018】上記模式図 (A) 及び (B) における記号は以下のことを意味する。

①: GlcNAc-6P 2-エピメラーゼ

②: NeuAc リアーゼ

③: CMP-NeuAc シンセターゼ

④: NeuAc シンセターゼ

【0019】(1) 酵素等の調製

上記 (A) 及び (B) の反応系に添加する N-アセチルグルコサミン-6リン酸 2-エピメラーゼ (GlcNAc-6P 2-エピメラーゼ) 活性を有する菌体またはその処理物とは、上記①の GlcNAc 6-リン酸から ManNAc 6-リン酸への変換反応を触媒する活性を有するものを意味し、上記 (A) の反応系に添加する N-アセチルノイラミン酸 リアーゼ (NeuAc リアーゼ) 活性を有する菌体またはその処理物とは、上記②の ManNAc とビルビン酸を基質として NeuAc を合成する反応を触媒する活性を有するものを意味し、上記 (B) の反応系に添加する N-アセチルノイラミン酸 シンセターゼ (NeuAc シンセターゼ) 活性を有する菌体またはその処理物とは、上記④の ManNAc とホスホエノールビルビン酸 (PEP) を基質として NeuAc を合成する反応を触媒する活性を有するものを意味し、上記 (A) 及び (B) の反応系に添加する CMP-NeuAc シンセターゼ (CMP-NeuAc シンセターゼ) 活性を有する菌体またはその処理物とは、上記③の NeuAc と CTP を基質として CMP-NeuAc を合成する反応を触媒する活性を有するものを意味する。

【0020】これらの酵素活性を有する菌体またはその処理物は、調製の簡便性などの点から、微生物由来のものを使用するのが好都合である。微生物由来の GlcNAc-6P 2-エピメラーゼ、N-アセチルノイラミン酸 リアーゼ、N-アセチルノイラミン酸 シンセターゼ及び CMP-NeuAc シンセターゼは公知の酵素であり、常法により調製することができる。

【0021】また、当該酵素活性を増強させるための手段として、該酵素遺伝子群 (J.Bacteriol., 181, 47-54, 1999, J.Bacteriol., 181, 4526-4532, 1999, Nucleic Acid s. Res., 13, 8843-8852, 1985, Agric. Biol. Chem., 50, 2155-2158, 1986, FEMS Microbiol. Lett., 75, 161-166, 1992, J. Biol. Chem., 271, 15373-15380, 1996, J. Biol. Chem., 264, 14769-14774, 1989, J.Bacteriol., 177, 312-319, 1995, Mol. Microbiol., 35, 1120-1134, 2000) をクローン化し、菌体内でこれを大量発現させた微生物種を用いる、いわゆる組換え DNA 手法を用いた方法を用いるのが好適である。その際に、2つ以上の遺伝子を共発現させて得られる菌体またはその処理物を用いることもできる。

【0022】遺伝子のクローニング、クローン化した D

## (5) 開2003-93091 (P2003-9A)

NA断片を用いた発現ベクターの調製、発現ベクターを用いた目的とする酵素活性を有する酵素タンパク質の調製などは、分子生物学の分野に属する技術者にとっては周知の技術であり、具体的には、例えば「Molecular Cloning」(Maniatisら編、Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York(1982))に記載の方法に従って行うことができる。

【0023】たとえば、報告されている塩基配列をもとにプローブを合成し、微生物の染色体DNAより目的とする酵素活性を有する酵素タンパク質をコードする遺伝子を含むDNA断片をクローニングすればよい。クローン化に用いる宿主は特に限定されないが、操作性及び簡便性から大腸菌を宿主とするのが適当である。

【0024】クローン化した遺伝子の高発現系を構築するためには、たとえばマキザムーギルバートの方法(Methods in Enzymology, 65, 499(1980))もしくはダイデオキシシチンターミネーター法(Methods in Enzymology, 101, 20(1983))などを応用してクローン化したDNA断片の塩基配列を解析して該遺伝子のコーディング領域を特定し、宿主微生物に応じて該遺伝子が菌体中で自発現可能となるように発現制御シグナル(転写開始及び翻訳開始シグナル)をその上流に連結した組換え発現ベクターを作製する。

【0025】ベクターとしては、種々のプラスミドベクター、ファージベクターなどが使用可能であるが、大腸菌菌体内で複製可能であり、適当な薬剤耐性マーカーと特定の制限酵素切断部位を有し、菌体内のコピー数の高いプラスミドベクターを使用するのが望ましい。具体的には、pBR322(Gene, 2, 95(1975))、pUC18、pUC19(Gene, 33, 103(1985))などを例示することができる。

【0026】作製した組換えベクターを用いて大腸菌を形質転換する。宿主となる大腸菌としては、例えば組換えDNA実験に使用されるK12株、C600菌、JM105菌、JM109菌(Gene, 33, 103-119(1985))などが使用可能である。ビルビン酸のNeuAc合成以外での代謝を減らすため、ビルビン酸代謝に関するlip遺伝子変異などが導入された大腸菌(例えばW14851ip2(ATCC25645))を宿主として使用することもできる。大腸菌を形質転換する方法はすでに多くの方法が報告されており、低温下、塩化カルシウム処理して菌体内にプラスミドを導入する方法(J. Mol. Biol., 53, 159(1970))などにより大腸菌を形質転換することができる。

【0027】得られた形質転換体は、当該微生物が増殖可能な培地中で増殖させ、さらにクローン化した目的とする酵素活性を有するタンパク質の発現を誘導して菌体内に当該酵素タンパク質が大量に蓄積するまで培養を行う。形質転換体の培養は、炭素源、窒素源などの当該微生物の増殖に必要な栄養源を含む培地を用いて常法

に従って行えばよい。例えば、培地としてブイヨン培地、LB培地(1%トリプトン、0.5%イーストエキストラクト、1%食塩)または2×YT培地(1.6%トリプトン、1%イーストエキストラクト、0.5%食塩)などの大腸菌の培養に常用されている培地を用い、30~50℃の培養温度で10~50時間程度必要により通気攪拌しながら培養することができる。また、ベクターとしてプラスミドを用いた場合には、培養中におけるプラスミドの脱落を防ぐために適当な抗生物質(プラスミドの薬剤耐性マーカーに応じ、アンピシリン、カナマイシンなど)の薬剤を適当量培養液に加えて培養する。

【0028】目的の酵素活性を有する菌体としては、上記の方法で得られる培養液から遠心分離、膜分離などの固液分離手段で回収したものを例示することができる。また、回収した菌体を、機械的破壊(ワーリングブレンダー、フレンチプレス、ホモジナイザー、乳鉢などによる)、凍結融解、自己消化、乾燥(凍結乾燥、風乾などによる)、酵素処理(リゾチームなどによる)、超音波処理、化学処理(酸、アルカリ処理などによる)などの一般的な処理法に従って処理して得られる処理物、もしくは該菌体処理物から目的の酵素活性を有する画分を通常の酵素の精製手段(塩析処理、等電点沈澱処理、有機溶媒沈澱処理、透析処理、各種クロマトグラフィー処理など)を施して得られる粗酵素または精製酵素も菌体処理物として利用することができる。

【0029】次にCMPからCTPへの変換に使用する酵母としては、市販のパン酵母、あるいはワイン酵母がよく、菌体製造の過程が省略できる点で極めて有利である。また、酵母生菌体、酵母乾燥菌体いずれの形態も利用可能であるが、反応収率、取扱いの容易性などの点からは、乾燥酵母菌体を用いるのが好ましい。

【0030】(2)CMP-NeuAcの合成  
CMP-NeuAc合成反応に使用するGlcNAc、ビルビン酸およびCMPは市販されており、この市販品を使用することができる。使用濃度としては、例えばそれぞれ1~5000mM、好ましくは10~1000mMの範囲から適宜設定することができる。

【0031】(NeuAcリアーゼを用いた方法)CMP-NeuAcの合成反応は、GlcNAc、CMPおよびビルビン酸を含む反応系に、GlcNAc-6P2-エピメラーゼ活性を有する菌体またはその処理物、NeuAcリアーゼ活性を有する菌体またはその処理物、およびCMP-NeuAcシンセターゼ活性を有する菌体またはその処理物を反応液1ml当たりそれぞれ0.2mg以上、好ましくは2~100mg、乾燥酵母を1~20%(w/v)添加し、50℃以下、好ましくは15~40℃で1~150時間程度、必要により攪拌しながら反応させることにより実施できる。

【0032】また、上記反応においては、GlcNAc

## (6) 開2003-93091 (P2003-91A)

およびビルビン酸を含有する反応系に、GlcNAc-6P 2-エピメラーゼ活性を有する菌体またはその処理物およびNeuAcリアーゼ活性を有する菌体またはその処理物を添加して、50℃以下、好ましくは15～40℃で1～50時間程度反応させてNeuAcを合成し、次いでCMP、酵母菌体およびCMP-NeuAcシンセターゼ活性を有する菌体またはその処理物を添加し、5～50時間程度反応させてCMP-NeuAcを合成する2段階の反応を行うことでCMP-NeuAcの合成収率を向上させることができる。なお、CMPはあらかじめNeuAc合成時に反応系に添加しておいてもかまわない。

【0033】(NeuAcシンセターゼを用いた方法) CMP-NeuAcの合成反応は、GlcNAc及びCMPを含有する反応系に、GlcNAc-6P 2-エピメラーゼ活性を有する菌体またはその処理物、NeuAcシンセターゼ活性を有する菌体またはその処理物、およびCMP-NeuAcシンセターゼ活性を有する菌体またはその処理物を反応液1ml当たりそれぞれ0.2mg以上、好ましくは2～100mg、乾燥酵母を1～20% (w/v) 添加し、50℃以下、好ましくは15～40℃で1～150時間程度、必要により攪拌しながら反応させることにより実施できる。

【0034】上記のいずれのCMP-NeuAc合成系においても、必要に応じて無機リン酸、マグネシウムおよびエネルギー源を添加するのが好ましい。無機リン酸としては、リン酸カリウムなどをそのまま使用することもできるが、好ましくはリン酸緩衝液の形態で使用するのが好ましい。使用濃度は、たとえば1～1000mM、好ましくは10～400mMの範囲から適宜設定することができる。また、リン酸緩衝液の形式で使用する場合、緩衝液のpHは5～10の範囲から適宜設定すればよい。

【0035】マグネシウムとしては、硫酸マグネシウム、硝酸マグネシウム、塩化マグネシウム等の無機酸のマグネシウム塩、クエン酸マグネシウム等の有機酸のマグネシウム塩を使用することができ、その使用濃度としては1～1000mMの範囲から適宜設定することができる。エネルギー源としては、グルコース、フラクトース、ショ糖などの糖類、酢酸、クエン酸などの有機酸を使用することができ、その使用濃度としては、1～500mM、好ましくは10～1000mMの範囲から適宜設定することができる。

【0036】このようにして得られたCMP-NeuAcは、糖ヌクレオチドの通常の単離精製手段(イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、塩析、アフィニティクロマトグラフィーなど)を用いて単離精製することができる。

【0037】

【発明の効果】本発明のNeuAcリアーゼを用いる方

法は、高価なATPを必要とせず、安価なGlcNAc、CMP及びビルビン酸から効率的にCMP-NeuAcを製造することが初めて可能となり、CMP-NeuAcの大量合成法として極めて有意義な方法である。

【0038】また、本発明のNeuAcシンセターゼを用いる方法は、高価なATPを必要とせず、反応系に必須のホスホエノールビルビン酸(PEP)はグルコースから酵母並びに大腸菌の生体(代謝)反応により合成・供給されるので、反応系にホスホエノールビルビン酸(PEP)を添加する必要がなく、安価なGlcNAc及びCMPから効率的にCMP-NeuAcを製造することが初めて可能となり、CMP-NeuAcの大量合成法として極めて有意義な方法である。特に、本発明のNeuAcシンセターゼを用いる方法は、本発明のNeuAcリアーゼを用いる方法で用いられる2段階の反応を必要としない点で、より簡便で優れた方法である。

【0039】

【実施例】以下、実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明がこれに限定されないことは明らかである。なお、実施例におけるDNAの調製、制限酵素による切断、T4DNAリガーゼによるDNA連結、並びに大腸菌の形質転換法は全て「Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition」(Sambrookら編、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989))に従って行った。また、制限酵素、Amp<sup>li</sup>Taq DNAポリメラーゼ、T4DNAリガーゼは宝酒造(株)より入手した。

【0040】さらに、反応液中のCMP-NeuAcの定量はHPLC法により行った。具体的には、分離にはYMC社製のODS-HS302カラムを用い、溶出液として1mM テトラブチルアンモニウム硫酸塩、50mM 酢酸マグネシウム溶液を用いた。また、NeuAc等の糖の定量にはHPAE-PAD法によるHPLCにより行った。具体的には、分離、検出にはダイオネクス社製のCarboPac PA1カラム、ED40を用い、溶出液としてA液：0.1N NaOH B液；0.1N NaOH、0.5M 酢酸ナトリウムを用い、A液-B液のグラジエントにより行った。

【0041】実施例1

(1) N-アセチルノイラミン酸リアーゼをコードするnanA遺伝子のクローニング  
H. influenzae Rd株の染色体DNA(ATCC51907D)をテンプレートとして、以下に示す2種類のプライマーDNAを常法に従って合成し、PCR法によりH. influenzaeのN-アセチルノイラミン酸リアーゼ(nanA)遺伝子を増幅した。  
プライマー(A)：5' - CACCATGGCGAAGATATTGCCGCTCAA  
ACTA -3'  
プライマー(B)：5' - CCGAATTCATTTATGACAAAAATTCG  
CTTCAAG -3'

(7) 開2003-93091 (P2003-90A)

【0042】PCRによるnanA遺伝子の増幅は、反応液100 $\mu$ l中(50mM 塩化カリウム、10mM トリス塩酸(pH8.3)、1.5mM 塩化マグネシウム、0.001%ゼラチン、テンプレートDNA 0.1 $\mu$ g、プライマーDNA(A)(B)各々0.2 $\mu$ M、Ampli Taq DNAポリメラーゼ 2.5ユニット)をPerkin-Elmer Cetus Instrument社製 DNA Thermal Cyclerを用いて、熱変性(94 $^{\circ}$ C、1分)、アニーリング(55 $^{\circ}$ C、1.5分)、ポリメライゼーション(72 $^{\circ}$ C、3分)のステップを25回繰り返すことにより行った。

【0043】遺伝子増幅後、反応液をフェノール/クロロホルム(1:1)混合液で処理し、水溶性画分に2倍容のエタノールを添加しDNAを沈殿させた。沈殿回収したDNAを文献(Molecular Cloning、前述)の方法に従ってアガロースゲル電気泳動により分離し、1.2kb相当のDNA断片を精製した。該DNAを制限酵素NcoI及びEcoRIで切断し、同じく制限酵素NcoI及びEcoRIで消化したプラスミドpTrc99A(Pharmacia Biotech.社より入手)とT4DNAリガーゼを用いて連結した。連結反応液を用いて大腸菌JM109株(ATCC53323)を形質転換し、得られたアンピシリン耐性形質転換体よりプラスミドpTrcnanAを単離した。pTrcnanAは、pTrc99Aのtrcプロモーター下流のNcoI-EcoRI切断部位にH. influenzaeのnanA遺伝子の構造遺伝子を含むDNA断片が挿入されたものである。

【0044】(2)GlcNAc-6P 2-エピメラーゼをコードするnanE遺伝子のクローニング  
H. influenzae Rd株の染色体DNAをテンプレートとして、以下に示す2種類のプライマーDNAを常法に従って合成し、PCR法によりH. influenzaeのGlcNAc-6P 2-エピメラーゼ(nanE)遺伝子を増幅した。

プライマー(C):5'-GGTCTAGATTAAATGAGGGGTGTTATATGT-3'

プライマー(D):5'-TCGTCGACTTATCTTGCAGATTTCATGAATTAGCAACCA-3'

【0045】PCRによるnanE遺伝子の増幅は、反応液100 $\mu$ l中(50mM 塩化カリウム、10mM トリス塩酸(pH8.3)、1.5mM 塩化マグネシウム、0.001%ゼラチン、テンプレートDNA 0.1 $\mu$ g、プライマーDNA(C)(D)各々0.2 $\mu$ M、Ampli Taq DNAポリメラーゼ 2.5ユニット)をPerkin-Elmer Cetus Instrument社製 DNA Thermal Cyclerを用いて、熱変性(94 $^{\circ}$ C、1分)、アニーリング(55 $^{\circ}$ C、1.5分)、ポリメライゼーション(72 $^{\circ}$ C、3分)のステップを25回繰り返すことにより行った。

【0046】遺伝子増幅後、反応液をフェノール/クロロホルム(1:1)混合液で処理し、水溶性画分に2倍容のエタノールを添加しDNAを沈殿させた。沈殿回収したDNAを文献の方法(Molecular Cloning、前述)に従ってアガロースゲル電気泳動により分離し、720b相当のDNA断片を精製した。該DNAを制限酵素XbaI及びSalIで切断し、同じく制限酵素XbaI及びSalIで消化したプラスミドpTrc99AとT4DNAリガーゼを用いて連結した。連結反応液を用いて大腸菌JM109株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性形質転換体よりプラスミドpTrc-nanEを単離した。pTrc-nanEは、pTrc99Aのtrcプロモーター下流のXbaI-SalI切断部位にH. influenzaeのnanE遺伝子の構造遺伝子を含むDNA断片が挿入されたものである。

【0047】(3)nanA、nanE遺伝子共発現プラスミドの構築

上記(1)で得られたpTrcnanAプラスミドを制限酵素NcoI、EcoRIで切断し、nanA遺伝子を含むNcoI-EcoRI断片をアガロースゲル電気泳動を用いて回収した。これを同じくNcoI、EcoRIで消化した上記(2)で得られたpTrc-nanEプラスミドとT4DNAライゲースを用いて連結した。この連結反応液を用いて大腸菌JM109株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性形質転換体よりプラスミドpTrcAEを単離した。pTrcAEは、pTrc99Aのtrcプロモーター下流のNcoI-SalI切断部位にH. influenzaeのnanA、nanE遺伝子の構造遺伝子を含むDNA断片が挿入されたものである。

【0048】(4)NeuAcの合成

(3)で構築したプラスミドpTrcAEを保持する大腸菌W14851ip2(ATCC25645)を、100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含む2 $\times$ YT培地500mlに接種し、37 $^{\circ}$ Cで振とう培養した。菌体数が1 $\times 10^8$ 個/mlに達した時点で、培養液に最終濃度0.2mMになるようにイソプロピル $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を添加し、さらに37 $^{\circ}$ Cで26時間振とう培養を続けた。培養終了後、遠心分離(9,000 $\times$ g、10分)により25ml培養液分の菌体50mgを回収し、これに100mM GlcNAc、20mM 塩化マグネシウム、50mM グルコース、300mM ビルビン酸ナトリウム、0.5%(v/v)キシレンを含む200mM リン酸カリウム緩衝液(pH8.0)5mlを添加し、28 $^{\circ}$ Cで攪拌しながら反応を行った。14、24時間後に110mgのビルビン酸ナトリウムを添加し、48時間で反応液を100 $^{\circ}$ C、5分間の熱処理をすることで反応を停止させた。得られた反応液を糖分析用HPLC(HPAE-PAD、ダイオネクス社)で分析したところ、43.7m



(8) 開2003-93091 (P2003-9釘綴

MのNeuAcの生成が確認された。なお、対照菌 (pTrc99Aプラスミドを保持する大腸菌W14851ip2) を用いて同様の反応を行ったが、NeuAcの生成を検出することは出来なかった (0.5mM以下の生成)。

【0049】(4) CMP-NeuAcシンセターゼをコードするneuA遺伝子のクローニング

H. influenzae HI914菌の染色体DNAをテンプレートとして、以下に示す2種類のプライマーDNAを常法に従って合成し、PCR法によりH. influenzaeのCMP-NeuAcシンセターゼ (neuA) 遺伝子を増幅した。

プライマー (E) : 5' - TGCCATGGTGAAAATAATATGACAAGAA -3'

プライマー (F) : 5' - AACTGCAGTGCAGATCAAAGTGCGGCC -3'

【0050】PCRによるneuA遺伝子の増幅は、反応液100μl中 (50mM 塩化カリウム、10mM トリス塩酸 (pH8.3)、1.5mM 塩化マグネシウム、0.001%ゼラチン、テンプレートDNA 0.1μg、プライマーDNA (E) (F) 各々0.2μM、Ampli Taq DNAポリメラーゼ 2.5ユニット) をPerkin-Elmer Cetus Instrument社製 DNA Thermal Cyclerを用いて、熱変性 (94℃、1分)、アニーリング (55℃、1.5分)、ポリメライゼーション (72℃、3分) のステップを25回繰り返すことにより行った。

【0051】遺伝子増幅後、反応液をフェノール/クロロホルム (1:1) 混合液で処理し、水溶性画分に2倍容のエタノールを添加しDNAを沈殿させた。沈殿回収したDNAを文献の方法 (Molecular Cloning、前述) に従ってアガロースゲル電気泳動により分離し、720b相当のDNA断片を精製した。該DNAを制限酵素NcoI及びPstIで切断し、同じく制限酵素NcoI及びPstIで消化したプラスミドpTrc99AとT4DNAリガーゼを用いて連結した。連結反応液を用いて大腸菌JM109株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性形質転換体よりプラスミドpTrcsiaBNPを単離した。pTrcsiaBNPは、pTrc99Aのtrcプロモーター下流のNcoI-PstI切断部位にH. influenzaeのneuA遺伝子の構造遺伝子を含むDNA断片が挿入されたものであ

る。

【0052】(5) CMP-NeuAcシンセターゼの調製

プラスミドpTrcsiaBNPを保持する大腸菌JM109菌を、100μg/mlのアンピシリンを含有する2×YT培地100mlに植菌し、37℃で振とう培養した。4×10<sup>8</sup>個/mlに達した時点で、培養液に最終濃度0.25mMになるようにIPTGを添加し、さらに37℃で6時間振とう培養を続けた。培養終了後、遠心分離 (9,000×g、10分) により菌体を回収し、5mlの緩衝液 (100mM トリス塩酸 (pH7.8)、10mM MgCl<sub>2</sub>) に懸濁した。超音波処理を行って菌体を破碎し、さらに遠心分離 (20,000×g、10分) により菌体残さを除去した。

【0053】このように得られた上清画分を酵素液とし、酵素液におけるCMP-NeuAcシンセターゼ活性を測定した結果を対照菌 (pTrc99Aを保持する大腸菌K-12株 JM109) と共に下記表1に示す。なお、本発明におけるCMP-NeuAcシンセターゼ活性の単位 (ユニット) は、以下に示す方法で5'-CMPとN-アセチルノイラミン酸からのCMP-NeuAcの合成活性を測定、算出したものである。

【0054】(CMP-NeuAcシンセターゼ活性の測定と単位の算出法) 50mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0)、20mM 塩化マグネシウム、5mM CTPおよび10mM N-アセチルノイラミン酸に、CMP-NeuAcシンセターゼを添加して37℃で5分反応させる。また、CMP-NeuAcシンセターゼの代わりにpTrc99Aを保持する大腸菌JM109株の菌体破碎液を用い同様の反応を行い、これをコントロールとした。反応液に2倍量の70%エタノールを添加して反応を停止し、これを希釈した後HPLCによる分析を行った。分離にはYMC社製HS-302カラムを用い、溶出液として50mM酢酸マグネシウムと1mMテトラブチルアンモニウム水溶液の混合液を用いた。HPLC分析結果から反応液中のCMP-NeuAcの量を算出し、37℃で1分間に1μmoleのCMP-NeuAcを合成する活性を1単位 (ユニット) としてCMP-NeuAcシンセターゼ活性を算出した。

【0055】

【表1】

菌/プラスミド	CMP-NeuAcシンセターゼ活性 (units/mg protein)
JM109/pTrc99A	<0.01
JM109/pTrcsiaBNP	2.45

【0056】(6) CMP-NeuAcの合成  
上記(3)で構築したプラスミドpTrcAEを保持す

る大腸菌 K-12株ME8417 (FERM BP-6847:平成11年8月18日 特許生物寄託センタ

## (9) 開2003-93091 (P2003-98(A))

ーに寄託)を、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含有する $2\times\text{YT}$ 培地 $500\text{ml}$ に接種し、 $37^\circ\text{C}$ で振とう培養した。菌体数が $4\times 10^8$ 個/ $\text{ml}$ に達した時点で、培養液に最終濃度 $0.2\text{mM}$ になるようにIPTGを添加し、さらに $37^\circ\text{C}$ で8.5時間振とう培養を続けた。培養終了後、遠心分離(9,000 $\times g$ 、10分)により $25\text{ml}$ 培養液分の菌体 $50\text{mg}$ を回収し、これに $50\text{mM}$  CMP、 $100\text{mM}$  GlcNAc、 $20\text{mM}$  塩化マグネシウム、 $50\text{mM}$  グルコース、 $250\text{mM}$  ビルビン酸ナトリウム、 $0.5\%$  (v/v) キシレンを含有する $200\text{mM}$  リン酸カリウム緩衝液(pH8.0)  $5\text{ml}$ を添加し、 $28^\circ\text{C}$ で攪拌しながら反応を行った。

【0057】反応開始24時間後に乾燥パン酵母(オリエンタル酵母社製)  $250\text{mg}$ 、上記(5)で調製したCMP-NeuAcシンセターゼ活性(3.4 unit s/ $\text{ml}$ 反応液)を有する酵素調製物及び $1\text{M}$  塩化マグネシウム溶液  $100\mu\text{l}$ を添加し、合計62時間反応させた。なお、反応開始14時間後に $110\text{mg}$ のビルビン酸ナトリウムを、24.38時間後に $110\text{mg}$ ビルビン酸ナトリウム、 $180\text{mg}$ グルコースを、48時間後に $55\text{mg}$ ビルビン酸ナトリウム、 $180\text{mg}$ グルコースをそれぞれ添加した。反応液上清をHPLCにより分析したところ、 $21.4\text{mM}$ のCMP-NeuAcが生成することが認められた。

## 【0058】比較例1

(1) CMPカイネースをコードするcmk遺伝子のクローニング

大腸菌JM109株の染色体DNAを斉藤と三浦の方法(Biochim. Biophys. Acta., 72, 619 (1963))で調製した染色体DNAをテンプレートとして、以下に示す2種類のプライマーDNAを常法に従って合成し、PCR法により大腸菌のCMPカイネース(cmk)遺伝子を増幅した。

プライマー(G):  $5' - \text{TTGAATTCTAAGGAGATAAAGATGACG GCAATT} - 3'$

プライマー(H):  $5' - \text{TTGAGCTCTGCAAATTCGGTCGCTTAT GCG} - 3'$

【0059】PCRによるcmk遺伝子の増幅は、反応液 $100\mu\text{l}$ 中( $50\text{mM}$  塩化カリウム、 $10\text{mM}$  トリス塩酸(pH8.3)、 $1.5\text{mM}$  塩化マグネシウム、 $0.001\%$ ゼラチン、テンプレートDNA  $0.1\mu\text{g}$ 、プライマーDNA(G)(H)各々 $0.2\mu\text{M}$ 、AmpliTaq DNAポリメラーゼ  $2.5$ ユニット)をPerkin-Elmer Cetus Instrument社製 DNA Thermal Cyclerを用いて、熱変性( $94^\circ\text{C}$ 、1分)、アニーリング( $55^\circ\text{C}$ 、1.5分)、ポリメライゼーション( $72^\circ\text{C}$ 、3分)のステップを25回繰り返すことにより行った。

【0060】遺伝子増幅後、反応液をフェノール/クロ

ロホルム(1:1)混合液で処理し、水溶性画分に2倍容のエタノールを添加しDNAを沈殿させた。沈殿回収したDNAを文献の方法(Molecular Cloning、前述)に従ってアガロースゲル電気泳動により分離し、 $720\text{b}$ 相当のDNA断片を精製した。該DNAを制限酵素EcoRI及びSacIで切断し、同じく制限酵素EcoRI及びSacIで消化したプラスミドpTrc99AとT4DNAリガーゼを用いて連結した。連結反応液を用いて大腸菌JM109株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性形質転換体よりプラスミドpTrcCMKABを単離した。pTrcCMKABは、pTrc99Aのtrcプロモーター下流のEcoRI-SacI切断部位に大腸菌のcmk遺伝子の構造遺伝子を含有するDNA断片が挿入されたものである。

【0061】(2) cmk、neuA遺伝子共発現プラスミドの構築

実施例2で得られたpTrcsiaBNPプラスミドを制限酵素NcoI、EcoRIで切断し、neuA遺伝子を含むNcoI-EcoRI断片をアガロースゲル電気泳動を用いて回収した。これを同じくNcoI、EcoRIで消化した上記比較例(1)のpTrcCMKABプラスミドとT4ライゲースを用いて連結した。この連結反応液を用いて大腸菌JM109株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性形質転換体よりプラスミドpTrcSBCKを単離した。pTrcSBCKは、pTrc99Aのtrcプロモーター下流のNcoI-SacI切断部位にH. influenzaeのneuA遺伝子及び大腸菌のcmk遺伝子の構造遺伝子を含有するDNA断片が挿入されたものである。

【0062】(3) CMP-NeuAcの合成

実施例1で調製した大腸菌ME8417/pTrcAEの $25\text{ml}$ 培養分の集菌体 $50\text{mg}$ に、 $100\text{mM}$  GlcNAc、 $20\text{mM}$  塩化マグネシウム、 $50\text{mM}$  グルコース、 $250\text{mM}$  ビルビン酸ナトリウム、 $0.5\%$  (v/v) キシレンを含有する $200\text{mM}$  リン酸カリウム緩衝液(pH8.0)  $2.5\text{ml}$ を添加し、 $28^\circ\text{C}$ で攪拌しながら24時間反応を行った。上記(2)で構築したプラスミドpTrcSBCKを保持する大腸菌ME8417株の $25\text{ml}$ 培養分の集菌体 $50\text{mg}$ と $100\text{mM}$  CMP、 $20\text{mM}$  塩化マグネシウム、 $250\text{mM}$  ビルビン酸ナトリウムを含有する $200\text{mM}$  リン酸カリウム緩衝液(pH8.0)  $2.5\text{ml}$ を添加後、超音波処理を行った。

【0063】反応開始24時間後、上記の超音波処理液 $2.5\text{ml}$ を添加し、更に $28^\circ\text{C}$ で攪拌しながら反応を行った。なお、反応開始14、24時間後に $55\text{mg}$ 、38時間後に $110\text{mg}$ のビルビン酸ナトリウムを添加した。合計48時間反応後、反応液上清をHPLCにより分析したところ、CMP-NeuAcの生成量は $6.28\text{mM}$ であった。

(10) 第2003-93091 (P2003-9A)

## 【0064】実施例2

(1) N-アセチルノイラミン酸シンセターゼをコードする *neuB1* 遺伝子のクローニング

*Campylobacter jejuni* 1652株の染色体DNAをテンプレートとして、以下に示す2種類のプライマー-DNAを常法に従って合成し、PCR法によりN-アセチルノイラミン酸シンセターゼ (*neuB1*) 遺伝子を増幅した。

プライマー (I) : 5' - TACGATTATTTTCCTGATGCTC -3'

プライマー (J) : 5' - TCTCCAAGCTGCATTAAAGCC -3'

【0065】PCRによる *neuB1* 遺伝子の増幅は、反応液100 $\mu$ l中(50mM 塩化カリウム、10mM トリス塩酸(pH8.3)、1.5mM 塩化マグネシウム、0.001%ゼラチン、テンプレートDNA 0.1 $\mu$ g、プライマー-DNA (A) (B) 各々0.2 $\mu$ M、Ampli Taq DNAポリメラーゼ 2.5ユニット)をPerkin-Elmer Cetus Instrument社製 DNA Thermal Cyclerを用いて、熱変性(94 $^{\circ}$ C、1分)、アニーリング(55 $^{\circ}$ C、1.5分)、ポリメライゼーション(72 $^{\circ}$ C、3分)のステップを30回繰り返すことにより行った。

【0066】遺伝子増幅後、反応液をフェノール/クロロホルム(1:1)混合液で処理し、水溶性画分に2倍容のエタノールを添加しDNAを沈殿させた。沈殿回収したDNAを文献(Molecular Cloning、前述)の方法に従ってアガロースゲル電気泳動により分離し、2.2kb相当のDNA断片を精製した。該DNA断片をテンプレートとして、以下に示す2種類のプライマー-DNAを常法に従って合成し、再度PCR法によりC. *jejuni*の *neuB1* 遺伝子を増幅した。

プライマー (K) : 5' -AAGGATCCTCTAGTGAGGCTTATGGAA-3'

プライマー (L) : 5' -GTCTGCAGATTTAATCTTAGAATAATCAGCCC-3'

【0067】PCRによる *neuB1* 遺伝子の増幅は、反応液100 $\mu$ l中(50mM 塩化カリウム、10mM トリス塩酸(pH8.3)、1.5mM 塩化マグネシウム、0.001%ゼラチン、テンプレートDNA 0.1 $\mu$ g、プライマー-DNA (A) (B) 各々0.2 $\mu$ M、Ampli Taq DNAポリメラーゼ 2.5ユニット)をPerkin-Elmer Cetus Instrument社製 DNA Thermal Cyclerを用いて、熱変性(94 $^{\circ}$ C、1分)、アニーリング(55 $^{\circ}$ C、1.5分)、ポリメライゼーション(72 $^{\circ}$ C、3分)のステップを25回繰り返すことにより行った。

【0068】遺伝子増幅後、反応液をフェノール/クロロホルム(1:1)混合液で処理し、水溶性画分に2倍容のエタノールを添加しDNAを沈殿させた。沈殿回収したDNAをアガロースゲル電気泳動により分離し、1.2kb相当のDNA断片を精製した。該DNAを制

限酵素BamHI及びPstIで切断し、同じく制限酵素BamHI及びPstIで消化したプラスミドpTrc99A (Pharmacia Biotech. 社より入手)とT4DNAリガーゼを用いて連結した。連結反応液を用いて大腸菌JM109株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性形質転換体よりプラスミドpTrcneuB1を単離した。pTrcneuB1は、pTrc99Aのtrcプロモーター下流のBamHI-PstI切断部位にC. *jejuni*の *neuB1* 遺伝子の構造遺伝子を含有するDNA断片が挿入されたものである(FERM P-18905:平成14年6月25日特許生物寄託センターに寄託)。

【0069】(2) nanE、*neuB1* 遺伝子共発現プラスミドの構築

上記(1)で得られたpTrcneuB1プラスミドを制限酵素BamHIで切断後、T4DNAポリメラーゼを用いて切断面を平滑化した。これを制限酵素PstIで切断し、*neuB1* 遺伝子を含む(BamHI)-PstI断片をアガロースゲル電気泳動を用いて回収した。続いて実施例1の(2)で得られたpTrcnanEプラスミドを制限酵素SalIで切断後、T4DNAポリメラーゼを用いて切断面を平滑化し、更に制限酵素PstIで切断した。これと上記で得られた*neuB1* 遺伝子を含む(BamHI)-PstI断片とをT4DNAライゲースを用いて連結した。この連結反応液を用いて大腸菌JM109株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性形質転換体よりプラスミドpTrcNENBを単離した。pTrcNENBは、pTrc99Aのtrcプロモーター下流のXbaI-PstI切断部位にH. *influenzae*のnanE遺伝子、並びにC. *jejuni*の *neuB1* 遺伝子の構造遺伝子を含有するDNA断片が挿入されたものである。

【0070】(3) CMP-NeuAcの合成

上記(2)で調製したプラスミドpTrcNENBを保持する大腸菌MC1061株(ATCC53338)の25ml培養液分の菌体50mgに50mM CMP、100mM GlcNAc、30mM 塩化マグネシウム、200mM グルコース、100mM ビルビン酸ナトリウム、0.5% (v/v) キシレン、4% (w/v) 乾燥パン酵母(オリエンタル酵母社製)、並びに実施例1の(5)で調製したCMP-NeuAcシンセターゼ活性(1.7 units/ml 反応液)を有する酵素調製物を含有する175mM リン酸カリウム緩衝液(pH8.0) 5mlを添加し、28 $^{\circ}$ Cで攪拌しながら72時間反応を行った。なお、反応開始14、24、38、48、62時間後に180mg グルコースをそれぞれ添加した。反応液上清をHPLCにより分析したところ、25.6mMのCMP-NeuAc生成が認められた。

【0071】

(11) 第2003-93091 (P2003-90) 序

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<;110>; Yamasa Corporation  
 <;120>; Process for producing cytidine 5'-monophospho-N-acetylneuraminic acid  
 <;130>; YP2002-011  
 <;140>;  
 <;141>;  
 <;160>; 12  
 <;170>; PatentIn Ver. 2.1  
 <;210>; 1  
 <;211>; 31  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; primer for amplification of nanA gene  
 <;400>; 1  
 caccatggcg aagatattgc cgctcaaact a 31  
 <;210>; 2  
 <;211>; 35  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; primer for amplification of nanA gene  
 <;400>; 2  
 ccgaattcat ttatgacaaa aatttcgctt tcaag 35  
 <;210>; 3  
 <;211>; 31  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; primer for amplification of nanE gene  
 <;400>; 3  
 ggtctagatt taaatgaggg gtgttatatg t 31  
 <;210>; 4  
 <;211>; 41  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; primer for amplification of nanE gene  
 <;400>; 4  
 tcgtcgactt atcttcgaga ttctactgaa ttagcaaacc a 41  
 <;210>; 5  
 <;211>; 29  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; primer for amplification of neuA gene  
 <;400>; 5  
 tgccatggtg aaaataataa tgacaagaa 29

(12) 2003-93091 (P2003-98A)

<210> 6  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> primer for amplification of neuA gene  
 <400> 6  
 aactgcagtg cagatcaaaa gtgcggcc 28  
 <210> 7  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> primer for amplification of cmk gene  
 <400> 7  
 ttgaattcta aggagataaa gatgacggca att 33  
 <210> 8  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> primer for amplification of cmk gene  
 <400> 8  
 ttgagctctg caaattcggc cgttatgcg 30  
 <210> 9  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> primer for amplification of neuB1 gene  
 <400> 9  
 tacgattatt ttctgatgc tc 22  
 <210> 10  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> primer for amplification of neuB1 gene  
 <400> 10  
 tctccaagct gcattaaacg cc 22  
 <210> 11  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> primer for amplification of neuB1 gene  
 <400> 11  
 aagatcctc tagtgaggt tatggaa 27  
 <210> 12  
 <211> 32

(13) 2003-93091 (P2003-904不綴

<;212>; DNA  
<;213>; Artificial Sequence  
<;220>;  
<;223>; primer for amplification of neuB1 gene  
<;400>; 12  
gtctgcagat ttaatcttag aataatcagc cc

32

【0072】